

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-188600

(43)Date of publication of application : 24.07.1990

(51)Int.Cl.

C07K 7/10  
A61K 37/02  
A61K 37/02  
A61K 37/02  
C07K 7/08  
// C07K 99:00

(21)Application number : 01-007944

(71)Applicant : CHUGAI PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 17.01.1989

(72)Inventor : KOISHIHARA YASUO  
MURAYAMA EIGOROU  
FUKUI HIROYASU

(54) BSF2 ANTAGONIST

(57)Abstract:

**NEW MATERIAL:** A polypeptide in which plurality of amino acids are lost from N ends and/or C ends of human B cell stimulation factor 2 expressed by the formula, etc., and having antagonism action to the human B cell stimulation factor 2.

**USE:** A remedy and diagnostic for arterial myxoma, carcinoma of uterine cervix, endotoxin, shock, myeloma, chronic rheumatism, etc.

**PREPARATION:** For example, a method for successively bonding amino acids whose  $\alpha$ -amino groups are protected according to normal Merrifield solid method by BOC method so as to synthesize a peptide chain is used and proceeding of coupling of the protected amino acid is carried out using Kaiser test while monitoring to provide the polypeptide in which plurality of amino acids are lost from N ends and/or C ends of human B cell stimulation factor 2.

PRO VAL PRO PRO LAY KLY ASP SER LYS ASP VAL  
ALA ALA PRO PRO HSE HSE CLE PRO SER PRO SER SER  
CLE ARE PHE ASP LYS CLE LLE HSE PHE LLE LYS  
ASP GLY LLE SER ALA LYS ARE LYS CLE THR CYS  
ASN LYS SER ASN MET CYS CLE SER SER LYS CLE  
ALA LYS ALA CLE ASN ASN LYS ASN LYS PRO LYS  
MET ALA CLE LYS ASP CLE CYS PRO CLE SER CLE  
PHE ASN CLE CLE THR CYS LYS VAL LYS LYS LYS  
THR CLE LYS LYS CLE PRO CLE VAL TYR LYS CLE  
THR LYS CLE ASN ARE PRO CLE SER SER CLE CLE  
CLE ALA ARE ALA THR CLE MET SER THR LYS VAL  
LEU LLE CLE THR LYS CLE LYS LYS ALA LYS ASP  
LEU ASP ALA LYS THR THR PHE ASP PRO THR THR  
ASN ALA SER LYS LYS THR LYS LYS CLE ALA CLE  
ASN CLE THR LYS CLE ASP MET THR THR THR LYS  
LEU LYS HSE SER PHE LYS CLE PRO LYS CLE SER  
SER LYS ARE ALA LYS ARE CLE MET

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出題公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-188600

⑬ Int. Cl.<sup>8</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)7月24日

C 07 K 7/10  
A 61 K 37/02

ZNA  
ABG  
ABN  
ADU

8318-4H  
8615-4C  
8615-4C

C 07 K 7/08  
// C 07 K 98:00

8318-4H

審査請求 未請求 請求項の数 15 (全6頁)

⑮ 発明の名称 B S F<sub>2</sub>アンタゴニスト

⑯ 特 願 平1-7944

⑰ 出 願 平1(1989)1月17日

⑱ 発 明 者	小 石 原 保 夫	静岡県御殿場市駒門1丁目135番地	中外製薬株式会社内
⑱ 発 明 者	村 山 榮 五 郎	静岡県御殿場市駒門1丁目135番地	中外製薬株式会社内
⑱ 発 明 者	福 井 博 泰	静岡県御殿場市駒門1丁目135番地	中外製薬株式会社内
⑲ 出 願 人	中外製薬株式会社	東京都北区浮間5丁目5番1号	
⑲ 代 理 人	弁理士 湯 浅 恭 三	外 4 名	

明 細 書

1. [発明の名称]

B S F<sub>2</sub>アンタゴニスト

2. [特許請求の範囲]

1. ヒトB細胞刺激因子2のN末端および/またはC末端より複数個のアミノ酸が欠損し、かつヒトB細胞刺激因子2に対し拮抗作用を有するポリペプチド。

2. ポリペプチドがヒトB細胞刺激因子2のN末端およびC末端より複数個のアミノ酸が欠損したものである請求項1記載のポリペプチド。

3. ポリペプチドのアミノ酸数が20個以上である請求項2記載のポリペプチド。

4. ポリペプチドのアミノ酸数が20乃至40個の範囲である請求項3記載のポリペプチド。

5. ポリペプチドが下記のアミノ酸配列のN末端およびC末端より複数個のアミノ酸が欠損したものである請求項1記載のポリペプチド。

PRO VAL PRO PRO GLY GLU ASP SER LYS ASP VAL  
ALA ALA PRO HIS ARG GLN PRO LEU THR SER SER  
GLU ARG ILE ASP LYS GLN ILE ARG TYR ILE LEU  
ASP GLY ILE SER ALA LEU ARG LYS GLU THR CYS  
ASN LYS SER ASN MET CYS GLU SER SER LYS GLU  
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY  
PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU VAL LYS ILE ILE  
THR GLY LEU LEU GLU PHE GLU VAL TYR LEU GLU  
TYR LEU GLN ASN ARG PHE GLU SER SER GLU GLU  
GLN ALA ARG ALA VAL GLN MET SER THR LYS VAL  
LEU ILE GLN PHE LEU GLN LYS LYS ALA LYS ASN  
LEU ASP ALA ILE THR THR PRO ASP PRO THR THR  
ASN ALA SER LEU LEU THR LYS LEU GLN ALA GLN  
ASN GLN TRP LEU GLN ASP MET THR THR HIS LEU  
ILE LEU ARG SER PHE LYS GLU PHE LEU GLN SER  
SER LEU ARG ALA LEU ARG GLN MET.

6. ポリペプチドが下記のアミノ酸配列の全部、または一部を連続して含むものである請求項1乃至請求項5のいずれかに記載のポリペプチド。

ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
7. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

SER ALA LEU ARG LYS GLU THR CYS  
ASN LYS SER ASN MET CYS GLU SER SER LYS GLU  
ALA LEU ALA GLU ASN ASN

8. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

THR CYS  
ASN LYS SER ASN MET CYS GLU SER SER LYS GLU  
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE

9. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

MET CYS GLU SER SER LYS GLU  
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
MET ALA GLU LYS ASP GLT CYS PHE

10. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

GLU SER SER GLU GLU  
GLN ALA ARG ALA VAL GLN MET SER THR LYS VAL  
LEU ILE GLN PHE LEU GLN LYS LYS ALA LYS ASN  
LEU ASP

15. ポリペプチドが該ポリペプチドの構造中の1個または複数個のアミノ酸を他のアミノ酸に置き換えた構造を有するものである請求項1乃至請求項14のいずれかに記載のポリペプチド。

### 3. [発明の詳細な説明]

#### <産業上の利用分野>

本発明はヒトB細胞刺激因子2(以下「BSF<sub>2</sub>」と称す)に拮抗作用を有するポリペプチドに関する。本発明のポリペプチドは医薬として有用である。

#### <従来の技術・発明が解決しようとする課題>

ヒトBSF<sub>2</sub>はB細胞の抗体産生細胞への分化を誘導する因子として研究されている。近年になってBSF<sub>2</sub>をコードするcDNAが単離され、DNA配列に関する情報および糖鎖されたBSF<sub>2</sub>の部分的なアミノ酸配列等より、BSF<sub>2</sub>は28

MET CYS GLU SER SER LYS GLU

ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY  
PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU

11. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

GLU SER SER LYS GLU  
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
MET ALA GLU LYS ASP

12. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY  
PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU

13. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU VAL LYS ILE ILE  
THR GLY LEU LEU GLU PHE GLU

14. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

アミノ酸残基のシグナルペプチドを有する184アミノ酸残基(下記アミノ酸配列(I)で示される)から構成されていることが明らかになった。

#### アミノ酸配列式(I):

PRO VAL PRO PRO GLY GLU ASP SER LYS ASP VAL  
ALA ALA PRO HIS ARG GLN PRO LEU THR SER SER  
GLU ARG ILE ASP LYS GLN ILE ARG TYR ILE LEU  
ASP GLY ILE SER ALA LEU ARG LYS GLU THR CYS  
ASN LYS SER ASN MET CYS GLU SER SER LYS GLU  
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY  
PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU VAL LYS ILE ILE  
THR GLY LEU LEU GLU PHE GLU VAL TYR LEU GLU  
TYR LEU GLN ASN ARG PHE GLU SER SER GLU GLU  
GLN ALA ARG ALA VAL GLN MET SER THR LYS VAL  
LEU ILE GLN PHE LEU GLN LYS LYS ALA LYS ASN  
LEU ASP ALA ILE THR THR PRO ASP PRO THR THR  
ASN ALA SER LEU LEU THR LYS LEU GLN ALA GLN  
ASN GLN TRP LEU GLN ASP MET THR THR HIS LEU  
ILE LEU ARG SER PHE LYS GLU PHE LEU GLN SER  
SER LEU ARG ALA LEU ARG GLN MET.

最近の知見を総合すると、B S F<sub>2</sub>はB細胞に抗体産生を誘導し、ハイブリドーマ、プラズマサイトーマ、ミエローマ等を増殖させ、HLA (human leukocyte antigen) クラス I 抗原の発現を誘導し、血液幹細胞にコロニーを誘導し、肝臓細胞に急性期蛋白質を誘導し、神経細胞に突起を誘導すると考えられる。この様にB S F<sub>2</sub>は種々の重要な生理活性を有し、広く細胞の増殖に関与していると考えられている。

一方、B S F<sub>2</sub>の異常産生が心房内粘液腫、子宮けい癌、エンドトキシン・ショック、ミエローマ(骨髄腫)、慢性関節リウマチ、キャスルマン症候群等の疾患における免疫異常の病因因子である可能性が報告されている(平野ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 84, 228頁, 1987年)。従ってB S F<sub>2</sub>の拮抗剤はこれらの疾患の治療薬または診断薬として期待される。しかしながらB S F<sub>2</sub>拮抗物質に関する報告はこれまで皆無である。

本発明者等はB S F<sub>2</sub>の分子構造、とりわけB S F<sub>2</sub>が細胞膜上に存在するB S F<sub>2</sub>レセプター

のポリペプチドはB S F<sub>2</sub>のアミノ酸配列から見た場合、概ね2つの群に大別される。一つの群は下記のアミノ酸配列式(Ⅱ)(この部分は前記アミノ酸配列式(Ⅰ)で示されるポリペプチドのN末端から数えて56〜66番目のアミノ酸配列に相当する)

アミノ酸配列式(Ⅱ):

ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
で示されるポリペプチドの全部、又は一部を連続して含むものであり、具体的には、例えば以下の(Ⅲ)〜(Ⅶ)に示すアミノ酸配列、で示されるポリペプチドである。

アミノ酸配列(Ⅲ):

SER ALA LEU ARG LYS GLU THR CYS  
ASN LYS SER ASN MET CYS GLU SER SER LYS GLU  
ALA LEU ALA GLU ASN ASN

アミノ酸配列(Ⅳ):

THR CYS  
ASN LYS SER ASN MET CYS GLU SER SER LYS GLU  
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE

と結合する部分の構造を研究する過程において、B S F<sub>2</sub>のN末端およびC末端より複数個のアミノ酸が欠損したポリペプチドがB S F<sub>2</sub>に対し拮抗作用を有することを見出した。B S F<sub>2</sub>の一部を構成するポリペプチドがB S F<sub>2</sub>に対し拮抗的に作用することは従来全く知られていない新知見である。本発明はこの知見に基づき更に検討を加えて完成したもので、B S F<sub>2</sub>に対し拮抗作用を有するポリペプチドに関するものである。このようなポリペプチドはB S F<sub>2</sub>が主因となっている疾患、例えば慢性関節リウマチ、ミエローマ(骨髄腫)、あるいはエンドトキシン・ショック治療薬として有望である。

＜課題を解決するための手段＞

本発明のB S F<sub>2</sub>に対するポリペプチドは、前記式(Ⅰ)で示すB S F<sub>2</sub>アミノ酸配列式のN末端および/またはC末端より複数個のアミノ酸が欠損したものである。このポリペプチドはアミノ酸数が20〜40個よりなるものであるが、特にこのアミノ酸数に限定されるものではない。本発明

アミノ酸配列(V):

MET CYS GLU SER SER LYS GLU  
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE

アミノ酸配列(VI):

MET CYS GLU SER SER LYS GLU  
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY  
PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU

アミノ酸配列(VII):

GLU SER SER LYS GLU  
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
MET ALA GLU LYS ASP

アミノ酸配列(VIII):

ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY  
PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU

また本発明は、これらの他に例えば以下に示す(Ⅸ)および(X)といったポリペプチドをも包含する。これらは前記アミノ酸配列(Ⅱ)の部分構造を

有していないポリペプチドである。

アミノ酸(IX):

PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU VAL LYS ILE ILE  
THR GLY LEU LEU GLU PHE GLU

アミノ酸配列(X):

GLU SER SER GLU GLU  
GLN ALA ARG ALA VAL GLN MET SER THR LYS VAL  
LEU ILE GLN PHE LEU GLN LYS LYS ALA LYS ASN  
LEU ASP

なお、本発明は、これらのポリペプチドに限定されるものではない。つまりある特定のポリペプチドの一個もしくは複数個のアミノ酸が他のアミノ酸に置き換えられた場合、またはこれらのアミノ酸が欠損した場合においても、ほぼ同等かそれ以上の活性を示すことはよく知られているところである。本発明においても同様に、前述したアミノ酸配列(Ⅲ)～(X)に示すポリペプチドまたはアミノ酸配列(I)で示されるBSF<sub>2</sub>の一部を構成するポリペプチドの一個もしくは複数個のアミノ酸を他のアミノ酸に置き換えたもの、または欠損

したものであっても本質的にBSF<sub>2</sub>の部分構造を含有し、かつBSF<sub>2</sub>に対し拮抗作用を有するポリペプチドは本発明に係るポリペプチドである。

本発明のポリペプチドは、その構成アミノ酸数が20～40個程度であり、特に組換えDNA技術を用いることなく、化学合成することができる。ペプチド合成は通常のMerrifield固相法(J. Med. Chem. 1979, 22, 586～588)に従ってBOC法により行った。カップリングの進行はKaiser試験(Anal. Biochem. 1970, 34, 585～588)を用いてモニターした。

以下本発明において製造した前記(Ⅲ)～(X)のアミノ酸配列を有するポリペプチドのアミノ酸分析の結果およびHPLC(高速液体クロマトグラフィ)分析の結果を表1に示す。なお、アミノ酸分析は本発明のポリペプチドを6N HClで120℃、15時間加水分解した後アミノ酸分析機MLC-203システム3(ATT0 社製)を用い常法に従って実施したものであり、HPLC分析はYMC-R & D(5 micron)(日本分光社製)カラ

ムを用いて0.1% TFA存在下、アセトニトリルを0%～70%のリニアグラジエント(linear gradient)を25分間で展開し(flow rate=1 ml/min)、260nmの紫外吸収によりモニターした結果である。

表 1

アミノ酸 ポリペプチド No.	(III)	(IV)	(V)	(VI)	(VII)	(VIII)	(IX)	(X)
ASP	3.8(4)	6.0(8)	4.0(4)	5.3(5)	4.0(4)	5.0(5)	1.2(1)	2.0(2)
GLU	4.2(4)	4.0(4)	4.0(4)	6.7(7)	3.7(4)	4.0(4)	3.7(4)	6.8(7)
SER	4.0(4)	2.7(3)	1.8(2)	2.6(3)	1.7(2)	1.2(1)		3.0(3)
GLY		1.2(1)	1.1(1)	2.3(2)	1.1(1)	2.3(2)	1.1(1)	
ARG	1.0(1)							1.0(1)
THR	0.9(1)	0.6(1)		1.0(1)		1.0(1)	2.0(2)	1.0(1)
ALA	2.2(3)	3.0(3)	3.0(3)	2.8(3)	3.2(3)	1.1(1)		2.8(3)
PRO		1.1(1)	1.0(1)	1.1(1)	1.1(1)	1.0(1)		
VAL							1.1(1)	2.1(2)
MET	1.1(1)	2.0(2)	1.8(2)	1.7(2)	1.0(1)	0.9(1)		1.1(1)
CYS	*(2)	*(3)	*(2)	*(3)		*(2)	*(1)	
ILE							1.4(2)	1.0(1)
LEU	2.1(2)	3.3(3)	3.0(3)	4.0(4)	3.0(3)	3.0(3)	3.1(3)	3.0(3)
PHE		1.3(1)	0.9(1)	1.7(2)		2.3(2)	2.1(2)	1.1(1)
LYS	2.8(2)	4.3(4)	2.8(3)	3.1(3)	2.8(3)	2.1(2)	1.0(1)	4.0(4)
Retention Time(min)	24.25	17.08	15.27	17.99	15.65	29.04	27.33	19.77

表中のポリペプチドのNo. は前述の各アミノ酸配列のNo. に対応している。( )内は推定されるアミノ酸数である。また \* 印はカウントされないものである。

次に本発明のポリペプチドのBSF<sub>2</sub>に対する拮抗作用を示す。拮抗作用は、96穴のマイクロプレートに各ウェルに1×10<sup>4</sup>個のSKW6 CL-4 (CL-4)細胞あるいはCESS細胞を加え、適当量のBSF<sub>2</sub>と共に5日間、CO<sub>2</sub>中インキュベーター中で培養する。培養上清を採取、上清に含まれる抗体(CL-4はIgM抗体を、CESSはIgM抗体を産生する)量をELISA法により定量する。本発明のポリペプチドのBSF<sub>2</sub>に対する拮抗作用を調べる目的には本発明のポリペプチドを最終濃度10<sup>-6</sup>～10<sup>-12</sup>Mの濃度範囲になるように適宜希釈し、BSF<sub>2</sub>を添加する30分前に加えて細胞と予め反応させる。本発明のポリペプチドの添加による抗体産生阻害率は次式により算出した。

$$\text{阻害率}(\%) = \left( 1 - \frac{\text{本発明のポリペプチド添加時の抗体量}}{\text{本発明のポリペプチド非添加時の抗体量}} \right) \times 100$$

その結果を次の表2に示す。なお表中の本発明のポリペプチドのNo. は前記第1表におけるポリペプチドに対応している。

表 2

ポリペプチド No.	阻害率(10 <sup>-n</sup> M)	
	CL-4 n=	CESS n=
(III)	48%(11)	89%(08)
(IV)	—	42%(09)
(V)	37%(12)	33%(11)
(VI)	62%(12)	59%(08)
(VII)	43%(10)	86%(13)
(VIII)	47%(11)	81%(11)
(IX)	43%(10)	48%(07)
(X)	78%(07)	87%(07)

表2に示すように本発明ポリペプチドはBSF<sub>2</sub>より誘導されるCL-4あるいはCESS細胞の抗体産生に対し阻害作用を有している。

<発明の効果>

本発明に係る種々のポリペプチドは、BSF<sub>1</sub>に対して阻抗剤として作用する。従って、これらのポリペプチドは、BSF<sub>1</sub>の異常発生によって引き起こされると考えられている心房内粘液腫、子宮けい癌、エンドトキシン・ショック、ミエローマ(骨髄腫)、慢性関節リウマチ、キャスルマン症候群等の免疫異常疾患に対する治療薬あるいは診断薬として利用することが期待されることから、本発明はこの種の免疫異常疾患に対する新たな治療薬及び診断薬への道を開くものとして医薬産業上きわめて有用である。

特許出願人 中外製薬株式会社

代理人 弁護士 湯 渡 恭



(外4名)